

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**POSSÍVEIS ASSOCIAÇÕES ENTRE MARCADORES GENÉTICO-
BIOQUÍMICOS E SENSIBILIDADE A MASTITE EM VACAS DA
RAÇA HOLANDÊS, PURA POR CRUZAMENTO, VARIEDADE
MALHADA DE PRETO, EM AMBIENTE TROPICAL**

LEANDRO REPETTI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – Área de concentração: Nutrição e Produção Animal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre.

Botucatu-SP
JULHO/2003

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**POSSÍVEIS ASSOCIAÇÕES ENTRE MARCADORES GENÉTICO-
BIOQUÍMICOS E SENSIBILIDADE A MASTITE EM VACAS DA
RAÇA HOLANDÊS, PURA POR CRUZAMENTO, VARIEDADE
MALHADA DE PRETO, EM AMBIENTE TROPICAL**

LEANDRO REPETTI
Médico Veterinário

ORIENTADOR: Prof. Dr. Paulo Roberto Rodrigues Ramos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – Área de concentração: Nutrição e Produção Animal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre.

Botucatu-SP
2003

Aos meus queridos pais José Carlos Repetti e Ivone dos Santos Repetti, pelo exemplo de vida, amor, carinho, incentivo, em todas as etapas de minha vida e à minha amada esposa Cláudia Sampaio Fonseca Repetti, pelo apoio, incentivo, coragem e pelo imenso amor que tenho por ela.

Agradecimentos

“À DEUS, por ter-nos dado forças para vencer obstáculos, por ter-nos feitos fortes, não permitindo que o cansaço nos dominasse, e se conseguimos chegar a este ideal, mais do que todo mundo, devemos ao Senhor...

Que a luz divina continue a iluminar o nosso caminho!

Conceda-nos, Senhor, a serenidade necessária para aceitar as coisas que não podemos mudar; coragem para mudar aquelas que podemos, sabedoria para distinguir uma das outras.”

Aos meus pais, que sempre procuraram mostrar o caminho correto do sucesso, e por acreditarem, e sempre me incentivarem nos meus objetivos, mesmo que algumas vezes parecessem inatingíveis.

Ao meu irmão, Fabrício Repetti, pela amizade e companheirismo.

À minha esposa, Cláudia, que durante o mestrado foi minha namorada, noiva, e agora esposa, e que se tornou uma das pessoas mais importantes de minha vida, que me faz enxergar todos os dias o valor do verdadeiro amor, por ter me ajudado em todos os períodos que dela precisei, pelo encorajamento e sábios conselhos que tem me dado em minha carreira profissional, sei que é apenas mais uma das muitas etapas que transporemos juntos.

Ao meu tio Aristeu Repetti, que sempre me proporcionou momentos de alegria, apoiando, dando incentivo, cobrando resultados, e que a fatalidade lhe tirou do nosso convívio, mas os bons momentos que passamos juntos estarão sempre em minha memória.

À Sra. Iolanda e ao Sr. Renato Fonseca, mesmo distantes, sempre me acolheram com palavras e sentimentos de alegria, carinho, incentivo e por fazer parte de uma nova família.

À Cíntia Zanconato pelos harmoniosos anos de convivência.

Ao Prof. Paulo Roberto Rodrigues Ramos, pela expressiva orientação e dedicação, pela amizade, pelo companheirismo e pelo apoio dispensado desde a fase de elaboração do projeto até a conclusão.

Ao amigo e Zootecnista Gercílio Alves Almeida Junior, pelo companheirismo profissional e por ter permitido a utilização dos animais desse experimento, e por passarmos momentos juntos de nossa pós-graduação.

À UNIMAR, (Universidade de Marília), por ter permitido a utilização de seu rebanho leiteiro, onde foi conduzido o experimento.

À técnica do laboratório do Departamento de Física e Biofísica, da UNESP, Cilene F. Padilha, e ao Biólogo Paulo Camargo, pelo auxílio, ensino e paciência no preparo de soluções e pela amizade.

Ao Professor Mário De Beni Arrigoni, e a Professora Sílvia Dierckx, da FMVZ-UNESP, Campos de Botucatu, pela amizade e pelas valiosas sugestões apresentadas.

Aos amigos e Professores Helmuth, Celso Bracciali, Fábio Manhoso, Rodolfo Spers, Francisco A. A. Souza, Clédson Garcia, Carlos E. Pacchini, Eliane Repetti Pacchini, Paulo Jorge, Paulo Visentini, da UNIMAR, pelo companheirismo e incentivo em minha carreira acadêmica e profissional.

Aos verdadeiros amigos da UNESP e da UNIMAR, que jamais serão por mim esquecidos.

Aos meus cães, que são grandes amigos fiéis, Uly e Lester, que me proporcionam momentos de alegria.

À CAPES pela bolsa de estudo cedida no mestrado.

A todos que contribuíram para minha formação e para concretização de mais esta importante etapa acadêmica.

SUMÁRIO

Página

CAPÍTULO 1	1
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	2
Referências	15
CAPÍTULO 2	19
POSSÍVEIS ASSOCIAÇÕES ENTRE MARCADORES GENÉTICO-BIOQUÍMICO E SENSIBILIDADE À MASTITE EM VACAS DA RAÇA HOLANDÊS, PURA POR CRUZAMENTO, VARIEDADE MALHADA DE PRETO, EM AMBIENTE TROPICAL	20
Resumo	20
Abstract	21
Introdução	22
Material e Métodos	24
Resultados	27
Discussão	31
Conclusões	33
Referências	34
Anexos.....	36

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A mastite é um processo inflamatório da glândula mamária, aguda ou crônica, e de grande importância num rebanho leiteiro pela diminuição significativa que provoca na produção de leite. A redução do custo de mastite bovina é necessária para manter os produtores leiteiros economicamente competitivos e o custo dos produtos lácteos razoável. Entretanto, os métodos atuais para reduzir a incidência de mastite contam com medidas profiláticas e terapêuticas que não são totalmente efetivos. Este é o motivo pelo quais outros métodos de controle são necessários, e uma abordagem é melhorar a resistência genética natural das vacas a patógenos do úbere (DETILLEUX, 2002).

Devido ao grande número de casos subclínicos, o diagnóstico depende amplamente de testes indiretos, que, por sua vez, dependem do conteúdo de leucócitos do leite. As perdas econômicas pela mastite são totais, causando diminuição na qualidade e da produção de leite, gastos com medicamentos, assistência técnica e reposição de animais. Diversas estratégias de melhoramento animal aliadas ao desenvolvimento de técnicas de genética molecular, resultaram em aumento da produção e modificação da composição do leite, melhorando sua qualidade (DEL LAMA e ZAGO, 1995).

O polimorfismo das proteínas do leite pode estar relacionado com produção, composição, e qualidade do leite. Assim sendo, a identificação de marcadores genéticos bioquímicos tem ampla aplicação em programas de seleção.

Desta forma, no presente trabalho pretendeu-se empregar técnicas de Marcadores Genético Bioquímicos com estudo de proteínas possivelmente associados à ocorrência de mastites.

É sabido que cada população possui uma grande quantidade de genes. Muitos genes possuem um ou mais alelos comuns em uma população. Esta coexistência de vários fenótipos distintos, comuns e geneticamente determinados em uma população, é conhecida como polimorfismo genético (HARGROVE et al., 1980).

A importância do estudo dos genes que controlam diferenças bioquímicas em animais está no conhecimento da origem das raças, sua evolução e parentesco. Possibilita também o melhor conhecimento dos problemas referentes à ação gênica e

síntese de proteínas. Em se tratando de bovinos, relaciona-se também com a produção de carne e leite (BORTOLOZZI, 1979).

O sistema polimórfico caracteriza-se pela ocorrência de um loco, com dois ou mais alelos alternativos, apresentando frequências gênicas que variam de 0,01 a 0,99 (MORTON, 1976). Os polimorfismos são na verdade variantes de proteínas geneticamente determinadas, geralmente identificadas por métodos eletroforéticos. O polimorfismo bioquímico de proteínas tem sido fonte de inúmeras investigações, tanto no homem como nos animais, principalmente os de interesse zootécnico. Os polimorfismos promovem a especialização genética em cada nível ecológico, permitindo à população animal ocupar com vantagem o ambiente. A seleção conserva os genes favoráveis formando um conjunto de genótipos relacionados com a capacidade de adaptação. Os genes que controlam o polimorfismo das proteínas são codominantes. Sendo assim, todas as combinações genotípicas possíveis podem ser evidenciadas através da eletroforese, isto é, todos os genótipos podem ser diretamente identificados a partir dos fenótipos observados. Em alguns casos, praticamente não há variação e os sistemas são, portanto, monomórficos, sem quase nenhum valor como marcadores genéticos (BORTOLOZZI; PAGANINI; MENDES, 1982).

Um sistema polimórfico é considerado de interesse como marcador genético quando a variante menos freqüente é suficiente para caracterizar um grupo étnico particular. A variabilidade e utilidade de cada sistema devem ser primeiro verificados em cada população, pois um sistema pode ser polimórfico e útil numa população, e não em outra.

Os principais mecanismos genéticos responsáveis pelos polimorfismos são a heterose e a seleção disruptiva. A heterose pode provocar a retenção de mais de um alelo em determinado loco, resultando em um polimorfismo que aumenta a capacidade adaptativa de uma população em seu habitat. Para as raças de animais domésticos amplamente dispersas, a seleção disruptiva tem desempenhado importante papel na criação de muitos polimorfismos. Os fluídos corporais e os cromossomos das espécies animais, são fontes importantes de estudo para os sistemas polimórficos. No que se refere aos líquidos corporais, os polimorfismos sangüíneos são os que têm sido estudadas com mais ênfases. Consideradas ferramentas úteis pelos melhoristas, pois podem ser associados a características zootécnicas desejáveis, os alelos variantes, normalmente denominados marcadores genético-bioquímicos, pois marcam uma estrutura

ou processo biológico, são largamente empregadas na identificação de paternidade, distâncias entre raças e entre cruzamentos (BORTOLOZZI; PAGANINI; MENDES 1982).

A maioria dos sistemas polimórficos de proteínas conhecidas nos animais, foram descobertos de acordo com a metodologia descrita por Smithies (1955), tendo o gel de amido como meio suporte.

Os grupos sangüíneos, as proteínas plasmáticas e as enzimas eritrocitárias mantêm o mesmo fenótipo ao longo da vida animal. A variabilidade, determinada geneticamente, resulta no aumento do número de marcadores genéticos, os quais podem ser identificados através de técnicas laboratoriais. Portanto, a eletroforese de proteínas em animais domésticos obtém medidas de variação genética e suas relações, além da contagem de genes marcadores, de acordo com o fenótipo protéico. Como os genes que codificam tais proteínas apresentam herança mendeliana simples, as variantes protéicas de sangue, marcadores genéticos, têm muitas aplicações (BORTOLOZZI; PAGANINI; MENDES, 1982).

A hemoglobina é o maior componente protéico dos glóbulos vermelhos. Sua molécula é constituída de quatro cadeias semelhantes de aminoácidos, duas a duas. Os membros de um par formam a cadeia alfa, e os outros a cadeia beta e diferem entre si apenas na seqüência de aminoácidos. Tem como função principal o transporte de oxigênio dos pulmões até os tecidos e o transporte de dióxido de carbono até os pulmões (RAMOS, 1986).

A descoberta da primeira variação genética de uma proteína detectada por Pauling et al. (1949) por meio de eletroforese de papel, foi o ponto de partida para o conhecimento atual dos vários tipos de hemoglobinas, tanto no homem como em animais. Os autores demonstraram que pessoas portadoras de anemia falciforme apresentavam um tipo de hemoglobina diferente das pessoas normais.

As duas variantes de hemoglobinas encontradas nos bovinos foram primeiramente descritas por Cabannes e Serain (1955). O tipo mais comum (HbA) é identificado por uma zona eletroforética de migração lenta e o outro tipo menos freqüente, caracterizada por uma zona eletroforética que migra com maior rapidez (HbB). Os animais heterozigotos apresentam as duas zonas, sendo, portanto um caso de codominância.

Schroeder et al. (1967) descreveram variantes na estrutura protéica primária das hemoglobinas A e B (HbA e HbB). As moléculas da cadeia alfa possuem 141 aminoácidos e as da cadeia beta apresentam 145 aminoácidos. As cadeias alfa das hemoglobinas A e

B são idênticas, enquanto que a cadeia beta da hemoglobina A difere da cadeia beta da hemoglobina B nos sítios 15, 18 e 19. Os aminoácidos identificados nessas posições são glicina, valina e lisina na HbA e serina, histidina e aspargina na HbB.

Balani, Ranjekar e Barnabas (1968) afirmaram que a hemoglobina está associada às características adaptativas, e que por sua vez a melhor adaptação reflete-se também, sobre o melhor desempenho produtivo e reprodutivo dos bovinos.

Foram identificados, em bovinos, de acordo com a mobilidade de suas bandas, seis tipos diferentes de hemoglobina. Os fenótipos dessa molécula receberam as seguintes designações: AA, BB, CC, A⁺ (Killary), DD, AE, AG, AB, BC e FF (SCHWELLNUS e GUÉRIN, 1977).

Khanna (1973) mostrou que o polimorfismo da hemoglobina apresenta três fenótipos: AA, BB e AB, os quais estão presentes nas raças zebu indianas. A hemoglobina B está em alta frequência nas raças indianas, podendo ser considerada como uma prova de adaptação genética ao meio ambiente e estar correlacionada à tolerância ao calor, taxas metabólicas e resistência a doenças.

Singh, Bhat e Singh (1981) pesquisaram entre 23 rebanhos diferentes, o polimorfismo da hemoglobina no gado puro e cruzado. Baseado nos três fenótipos conhecidos AA, BB e AB, todas as raças de zebu pura revelaram incidência significativa do alelo HbB com variações na frequência gênica entre os rebanhos, dentro e entre as raças.

Larsen e Thyman (1966) investigaram o polimorfismo da hemoglobina por eletroforese horizontal em gel de amido testando amostras de 2067 animais das raças Gir, Guzará, Nelore, Indubrasil e Tabapuã, os quais exibiram alta frequência dos alelos HbA e HbB, indicando que as populações estão em equilíbrio genético.

Balani, Ranjekar e Barnabas (1968) trabalhando com cruzamentos raciais entre Gir x Jersey e Bown Swiss x Frisian, encontraram uma associação altamente significativas dos tipos de hemoglobina com a idade ao primeiro cio, onde HbB é mais prevalente e está relacionado com a puberdade e maturidade sexual precoce.

Banghan (1957) observou, em três raças de bovinos (Jersey, Guernsey e South Devon), que os animais portadores de hemoglobina do tipo HbB apresentavam maior porcentagem de gordura no leite do que os de outros tipos.

As transferrinas foram descobertas na década de quarenta por Holmerg e Laurell (1945) e Shade e Caroline (1946). Fazem parte de uma classe especial de proteínas ligadoras de metal, as glicoproteínas, cujo peso molecular varia em torno de 88 kD.

Em bovinos foram descritos, diferentes tipos de transferrinas que passaram a ser designadas pelas letras A, B, C, D e E, de acordo com a mobilidade eletroforética (ASHTON, 1958). Posteriormente, esses mesmos autores descreveram três alelos codominantes autossômicos, responsáveis pela herança desses tipos (Tf^A , Tf^D , Tf^E). Cada alelo dá lugar a três ou quatro bandas, dependendo da espécie e da técnica utilizada.

No gado zebuino foram identificados mais dois alelos: Tf^B e Tf^F (ASHTON, 1959). Posteriormente, foi encontrada uma subdivisão do tipo D em dois tipos: D_1 e D_2 , de distinta transmissão hereditária, com os seguintes alelos: Tf^{D1} , Tf^{D2} dos quais o primeiro controlava a variante de maior mobilidade eletroforética (ASHTON, 1964). A literatura cita ainda outros tipos de transferrinas, como a H (Tf^H) que ocorre em gado italiano Piemontês (SARTORE ; BERNOCO, 1966) e a N (Tf^N), em algumas raças da África ocidental (BRAEND ; GASPARSKY, 1967).

Ashton (1959), Osterhoff e Heerden (1964) e Osterhoff e Neethling (1969) postularam que as raças apresentando o alelo Tf^E em alta frequência, caracterizariam animais com boa resistência ao estresse climático e, assim, indivíduos homozigotos Tf^E seriam mais resistentes ao calor que os homozigotos Tf^A e Tf^D ; por outro lado, os genótipos Tf^D/Tf^E e Tf^E/Tf^E estariam correlacionados com pouco ganho de peso e baixo coeficiente de conversão alimentar (OSTERHOFF ; NEETHLING, 1969).

Pelo menos 10 alelos autossômicos codominantes, foram descritos em bovinos, a saber: Tf^H , Tf^{A1} , Tf^{A2} , Tf^B , Tf^{D1} , Tf^{D2} , Tf^F , Tf^N , Tf^E e Tf^G , de acordo com a mobilidade eletroforética, em ordem decrescente, em gel de amido, sendo EE e DE os mais freqüentes (SINGH ; BHAT; SINGH, 1981).

Segundo Larsen e Thymann (1966), há uma associação significativa entre a produção leiteira e o genótipo das transferrinas. Fêmeas bovinas com locos Tf^D apresentaram maior produção do que aquelas com outros genótipos.

Abe, Oishi e Suzuki (1969) identificaram o polimorfismo das transferrinas em gado zebu, na Índia, sendo AA, AD, DD, DE, EE, e AE os fenótipos mais freqüentes.

Balani, Ranjekar e Barnabas (1968) relataram polimorfismo da transferrina em zebuínos criados no oeste de Cuba, com a ocorrência dos alelos Tf^A , Tf^D e Tf^E e elevada frequência do alelo Tf^E em animais de origem indiana.

Osterhoff, Young e Wardcox (1970) pesquisaram, no gado zebu do oeste africano, a frequência gênica para locos Tf em 1100 amostras, revelando um fenótipo heterozigoto não descrito previamente TfF/TfG.

Segundo Soos, Horvath e Solyom (1971), o sistema transferrina do gado bovino não é um polimorfismo balanceado e provavelmente é afetado pela presença de efeitos fisiológicos e/ou imunológicos desconhecidos.

Aschaffernburg e Drewry (1955) estudaram a relação entre transferrina e habilidade de transmissão da produção de touros da raça Holandês preto e branco. As filhas de touros TfAA e TfDD tinham maior porcentagem de gordura no leite do que aquelas filhas de touros TfAD, porém com maior produção de proteína no leite.

Ashton (1959) investigou 125 animais da raça Brown, determinando as variações de Tf e Hb para as características de produção de leite e índices de reprodução nas três primeiras lactações. Os sistemas revelaram desempenho favorável para os indivíduos HbAB e TfA, porém os testes estatísticos provaram que características de reprodução e produção não são influenciadas pelo polimorfismo da hemoglobina e transferrina.

A albumina sérica é uma proteína globular encontrada com relativa abundância no plasma dos animais. Simbolizada por Alb, apresenta pesos moleculares entre 65 e 70 kD de acordo com a espécie animal estudada: humanos, bovinos, eqüinos e roedores (CHARLWOOD, 1961). Sua principal função é a manutenção do equilíbrio osmótico, sendo responsável por 75 a 80% do efeito osmótico do plasma, pois constitui pouco mais da metade das proteínas plasmáticas em peso, apresentando o menor peso molecular dentre as principais proteínas plasmáticas. Outra função é o transporte de ácidos graxos e bilirrubinas. A albumina é uma das poucas proteínas plasmáticas que não é glicoproteica. Ocorrem em quantidades superiores a 50mg/dL de plasma, e sua forma é elipsóide, com dimensões moleculares de cerca de 30 por 150 Å (SMITH et al., 1983).

Apenas cerca de 40% da albumina estão presentes na circulação, sendo o restante encontrado no espaço extravascular de tecidos, sobretudo no músculo, na pele e no intestino. Apresentam grande afinidade a vitaminas, hormônios, íons metálicos e ácidos graxos (BENHOLD, 1962).

Além de suas funções osmóticas, a albumina desempenha um importante papel no transporte de diversas substâncias, muitas das quais são poucos solúveis em água. O metabolismo normal dos lipídios requer albumina. De particular importância é o transporte de ácidos graxos livres que se ligam fortemente à albumina, sendo assim transportados

do fígado para os tecidos periféricos. A albumina liga-se também a bilirrubina, transportando-a até o fígado, onde é excretada na bile. As concentrações plasmáticas de diversas substâncias, tais como Ca^{++} , hormônios esteróides e triptofano, são reguladas, de certo modo, pela sua ligação à albumina. Por fim muitas drogas como sulfonamidas, penicilina G, dicumarol, aspirina, etc., também se ligam fortemente à albumina (SMITH et al., 1983).

O polimorfismo da albumina foi detectado inicialmente por Ashton (1964) e Braend e Efremov (1965) que descreveram duas bandas distintas denominadas AlbA e AlbB, controladas por dois genes autossômicos codominantes. Posteriormente, outros tipos de albuminas foram identificados: G, D, E, F (Zâmbia), C e X, sendo os alelos denominados por Alb^A e Alb^B e de Alb^F e Alb^S . Soos (1971) estudando uma raça de gado húngaro, descobriu um novo fenótipo de albumina, que denominou de AlbH9.

De acordo com Putnam (1965) 43% das proteínas séricas de bovinos são constituídas de albuminas, umas das proteínas de maior mobilidades eletroforética. Kaneko e Cornelius (1970) verificaram que, quando um animal fica doente, geralmente a alteração mais acentuada é a da fração de albumina. Segundo esses autores, o nível das proteínas plasmáticas em um animal normal é também um perfil relativamente constante, e essa constância é controlada geneticamente.

Estudando genótipo de albumina sérica no gado bovino, Smith et al. (1983) encontraram dois alelos Alb A e Alb B, e uma relação altamente significativa entre os genótipos da albumina e o peso ao nascimento e produção de leite a primeira lactação. O alelo B foi associado com aumento de produção leiteira e maior peso ao nascimento.

Ashton (1964) estudaram polimorfismo bioquímico do gado da região centro norte da Espanha e determinaram 13 sistemas genéticos sanguíneos, entre eles; hemoglobina, transferrina e albumina, sendo que todos apresentaram polimorfismo. Encontraram uma variante de albumina designada como AlbD, com mobilidade intermediária entre os alelos AlbA e AlbB.

Palmer (1934) isolou a beta-lactoglobulina de amostras de leite desnatado, pela técnica de fracionamento com sulfato de sódio após remoção das caseínas pela precipitação ácida. Posteriormente, McKenzie (1967) empregando o fracionamento com sulfato de amônio, obtiveram uma quantidade de beta-lactoglobulina contaminada com uma “substância insolúvel cristalina”. Aschaffenburg (1968) modificou o método obtendo os dois tipos de proteínas, conforme citado por McKenzie (1967). A fração protéica do

soro lácteo por ele obtido consistia de beta-lactoglobulinas, chamada de proteína vermelha. As proteínas vermelha e verde foram removidas pela precipitação de albumina-séica com sulfato de amônio e, posteriormente, os cristais de beta-lactoglobulinas foram obtidos por diálise da mistura de proteínas de sobrenadante em pH 5,2.

Block e Weiss (1955) empregaram a cromatografia quantitativa em papel, pelo método da máxima densidade de cor, calculando as composições em aminoácidos das formas cristalinas da beta-lactoglobulinas, e da alfa-lactalbumina, mostrando diferenças substanciais entre elas. Os autores concluíram que o método empregado foi eficiente, pois os resultados concordaram a literatura, principalmente quanto à alfa-lactalbumina. Quanto à beta-lactoglobulina, as quantidades obtidas para arginina, histidina, leucina, isoleucina e ácido glutâmico, seus valores eram inferiores. A própria literatura consultada trazia dados discordantes, sugerindo certa heterogeneidade.

Até então numerosas investigações haviam sido feitas empregando a beta-lactoglobulina na forma cristalina, revelando heterogeneidade numa proteína considerada pura. Em geral, era usada uma mistura de leite de diversos animais, assumindo-se que a beta-lactoglobulina sintetizada pela glândula mamária seria a mesma em todos os animais, o que poderia não ser verdade. Assim sendo Aschaffenburg e Drewry (1955) empregaram a eletroforese em papel, utilizando tampão barbitona pH 8,6, 230 V por 16 horas, para examinarem amostras de leite de 70 vacas das seguintes raças: Shorthorn (27 vacas), Friesian (22 vacas), Ayshire (12 vacas) e Guernsey (9 vacas). Observou-se que, diferentes vacas produziam uma mistura de duas distintas frações de beta-lactoglobulina ou apenas uma delas. Os dois componentes foram chamados de β 1, o mais rápido, e β 2 o de migração mais lenta. O tipo de beta-lactoglobulina, produzido por um dado animal, se manteve o mesmo quando examinado em diferentes ocasiões, durante um, dois ou três períodos de lactação. Na amostra examinada, 30 vacas apresentaram o padrão β 1/ β 2; 33 β 2, ambos ocorrendo em todas as raças, e o padrão beta um apenas na Shorthorn (3) e na Friesian (4). Os autores estudaram ainda oito pares de gêmeas monozigóticas. Quatro delas eram β 1/ β 2, duas β 1 e duas β 2, sustentando a hipótese de que estas proteínas eram geneticamente determinadas. Com base nos resultados da eletroforese, os autores prepararam amostras cristalinas puras de β 1 e β 2 – lactoglobulinas. Observaram que os cristais formados pela β 1 apresentavam

formas retangulares idênticos aos descritos por Palmer (1934), enquanto que β 2 formava cristais tipo diamante.

Para estudarem a ocorrência de diferentes padrões de beta-lactoglobulinas e a possibilidade de um controle genético destas variantes, Aschaffenburg e Drewry (1957) empregaram a eletroforese em papel, pH 8,6 de amostras de leite de 278 vacas das raças Shorthorn (87), Friesian (87), Guernsey (27), Ayshire (54) e cruzados (23), incluindo 24 pares de gêmeas. Os autores propuseram uma alteração na nomenclatura, tendo em vista o provável controle genético dos componentes β 1 e β 2. Desta forma as proteínas poderiam ser chamadas de beta-lactoglobulina A, ao invés de β 1, beta-lactoglobulina B, ao invés de β 2 e beta-lactoglobulina AB ao invés de 1,2. Os animais poderiam ser descritos como de fenótipos para beta-lactoglobulina A/A, B/A ou B/B, e genótipo Lg^A/Lg^B , por exemplo, usando a notação Lg como símbolo do loco do gene que acreditavam estar envolvido.

Além das variantes A e B, outros dois componentes de menor mobilidade foram encontrados; a fração com mobilidade um pouco menor que a fração B foi chamada de C uma vez que os autores presumiram ser esta a variante descrita por Bell (1962). O componente mais lento foi chamado D

Mckenzie (1967) fez uma extensa revisão sobre a química, a física e a genética das proteínas do leite, e afirmou que a beta-lactoglobulina é um exemplo fascinante de evolução bioquímica onde pequenas trocas na composição em aminoácidos provocaram sensíveis alterações em suas propriedades. Fazendo-se uma comparação entre as composições em aminoácidos das variantes genéticas de beta-lactoglobulina, a variante A difere da B por +1 ácido aspártico; +1 valina, -1 glicina e -1 alanina, enquanto que a C difere da B por +1 histidina e -1 ácido glutâmico. A variante D_r é idêntica à variante A, contendo, entretanto, ácido siálico e glicosamina. Segundo o revisor alguns autores afirmam que as substituições de aminoácidos não acontecem nas regiões terminais das cadeias. Das beta-lactoglobulinas descritas apenas a variante A forma um octâmero em pH 4,6 a baixas temperaturas. Esta propriedade parece estar associada com um resíduo extra de ácido aspártico por monômero desta molécula. As beta-lactoglobulinas apresentam, predominantemente a forma demérita quando em concentrações moderadas e na região próxima de seu ponto isoelétrico. A tendência a dissociar-se dessa forma depende do pH, da temperatura e da força iônica do tampão que a contiver. A alfa-

lactalbumina por sua vez, apresenta interessantes propriedades de transporte de íons, polimerização e solubilidade, sendo que a tendência à polimerização é mais intensa em pH ácido (5,0) que em alcalino. O índice de formação de componentes pesados diminuiu com a diminuição do pH, da força iônica e da temperatura. E, baixos pHs a polimerização observada pode ser invertida rapidamente pelo ajuste do pH através de soluções ou géis acima do pI (5,1). Surpreendentemente o abaixamento o pH, ao redor de 3,8 resulta num decréscimo do índice de polimerização (fato que contraria considerações eletrostáticas). Segundo o autor, o baixo peso molecular (16.000 daltons) e a possibilidade do isolamento de polimorfismos genético-bioquímicos torna esta proteína muito interessante para estudos futuros.

No tocante à beta-lactoglobulina, os revisores admitiram a ocorrência das três variantes A, B e C, cujas composições em aminoácidos já foram determinadas, confirmaram também a presença da variante D e de variantes adicionais encontradas na raça Droughtmaster, na Austrália, que se acredita serem alelos das variantes A e B, designados por A_{Dr} e B_{Dr} . Já foi confirmada a contaminação por carboidratos, na variante A_{Dr} , não havendo informações mais consistentes que justifiquem alterações substanciais na nomenclatura. Devido aos avanços na imunologia, profundas modificações foram feitas na fração de euglobulinas e pseudoglobulinas. O termo Imunoglobulina vem substituir os termos “imunolactoglobulinas”, “gama-globulinas”, “euglobulinas”, “pseudo-globulinas” e “T-globulinas”. No leite bovino, ocorrem três classes antigenicamente distintas de imunoglobulinas, sendo designados por IgM (gama-M), IgA (gama-A) e IgG1 e IgG2. Maiores detalhes podem ser obtidos em Rose, Bruner e Kalan (1970).

Com o objetivo de se buscar marcadores genéticos que possam ser empregados em Zootecnia, Singh, Bhat e Singh (1981) estudaram uma possível associação entre genótipos polimórficos protéicos e características de produção, em vacas mestiças Holstein x Hariana e Holstein x Sahiwal. Os sistemas polimórficos estudados foram albumina, amilase, ceruloplasmina, hemoglobina, transferrina, beta-lactoglobulina e beta-caseína. As características econômicas estudadas foram: peso ao nascer, ao primeiro mês, ao terceiro mês, ao sexto mês, ao primeiro ano, ganho de peso diário durante 6 a 12 meses, idade ao primeiro parto, produção de leite à primeira lactação e duração de lactação. Genótipos de ceruloplasmina afetaram a produção de leite e o período de lactação enquanto que os genótipos de albumina influenciaram o peso ao nascer e a persistência em lactação em Friesian x Sahiwal e Friesian x Hariana. Animais de fenótipos

Cp AA e Alb Ab tiveram desempenho superior a CpCC e Alb AC. Segundo os autores, os genótipos de albumina são resultados de cruzamentos. O gado zebuino mantém as frequências de determinados alelos de proteínas polimórficas em níveis bem baixos, diferentemente do taurino, o que pode possivelmente conferir alguma vantagem no ambiente tropical. Assim sendo, as associações observadas em zebuínos não devem ser as mesmas observadas em populações européias. As relações entre genes marcadores e características quantitativas, são devidas principalmente a efeitos pleiotrópicos ou ligações, sendo que a hipótese de ligação é uma explicação mais apropriada.

Giesecke e Osterhoff (1986) estudaram 796 vacas da raça Friesland de oito rebanhos comerciais na África do Sul. Observaram que a herança da resistência ou da susceptibilidade à mastite séptica, diferia quanto ao fenótipo de beta-lactoglobulinas. Havia um aumento significativo de indivíduos resistentes à mastite com genótipos heterozigotos para o loco citado.

Ramos et al (1992) obtiveram dados de animais da raça Guzerá, caracterizando o polimorfismo bioquímico existente entre animais de uma mesma raça. A eletroforese de soro lácteo, em gel de poliacrilamida em disco, demonstrou um padrão de cinco bandas enquanto que um dos animais apresentou seis bandas. Esta alteração ocorreu ao nível das beta-lactoglobulina.

Define-se mastite como um processo inflamatório da glândula mamária, aguda ou crônica, sendo mais frequentes em ruminantes. Caracterizam-se por alterações físicas, químicas e bacteriológicas do leite.

Segundo Sordillo, Shafer-Weaver e Rosa (1997), a glândula mamária contém componentes bacteriostáticos que trabalham independentemente e juntos com as imunoglobulinas, além de fatores celulares que protegem a glândula mamária. Estes fatores incluem a lactoferrina, complemento, lisozima e o sistema peróxido hidrogênio-tiocianato-lactoperoxidase.

Há evidências de que a atividade dos neutrófilos no leite é menor do que aquela da corrente sanguínea, pois fagocitam partículas de caseína e glóbulos de gordura preferencialmente, tendo conseqüentemente menor atividade bactericida (CIFRIAN et al., 1996).

Há também o fato de que a própria caseína inibe a atividade bactericida lisossomal "in vitro". Apesar destas limitações, a atividade fagocitária dos neutrófilos, é a defesa primária mais eficaz da mama (COLDITZ ; WATSON, 1985).

Segundo Cifrian e Marquardt (1996) o cálcio e magnésio bivalentes, além da caseína, foram efetivos como inibidores dos danos das células mamárias, causadas pelos danos de toxinas nas vacas acometidas por *Staphylococcus aureus*. Desta forma, de acordo com Ramos (1992), a caseína, o cálcio e o magnésio podem ser considerados como defesa contra efeitos citotóxicos das toxinas bacterianas e vacas heterozigotas podem ter mais cálcio e caseína na composição do leite. Assim sendo, animais heterozigotos poderiam ser resistentes à mastite.

Colditz e Watson (1985), destacam que programas de melhoramento genético em vacas de leite na América do Norte focam principalmente a produção de leite com ênfase nas características de conformação. Considerando que estes autores verificaram que existe uma correlação genética negativa entre a capacidade de produção de leite e a resistência à mastite, as duas características devem ser consideradas num programa de melhoramento para se otimizar a produção. A SCC é também usada em várias regiões para incentivar pagamentos para baixa SCC ou penalidades para alta SCC. Sugere ainda que o uso apropriado da SCC e de avaliações genéticas pode prevenir um aumento da incidência de mastite associado com a seleção por produção ou por possíveis médias para aumentar a resistência à mastite.

Programas de vacinação estão sendo usados para potencializar o sistema imune do animal a um antígeno específico. Aumento dos títulos de anticorpos no leite são efetivos para diminuir a severidade da doença, mas não tem efeito para prevenir uma nova infecção. A tecnologia da vacina contra mastite tem melhorado consideravelmente nos últimos anos, mas a vacina não é completamente usada em programas de controle (SORDILLO, 1997).

Desta forma, o presente trabalho objetivou identificar a ocorrência do polimorfismo genético bioquímico nas proteínas sanguíneas (Hemoglobinas, Transferrinas e Albuminas), e a proteína do leite, Beta Lactoglobulina, tentando associá-lo à ocorrência de mastite em vacas da raça Holandês.

O capítulo 2, denominado **POSSÍVEIS ASSOCIAÇÕES ENTRE MARCADORES GENÉTICO-BIOQUÍMICO E SENSIBILIDADE À MASTITE EM VACAS DA RAÇA HOLANDÊS, PURA POR CRUZAMENTO, VARIEDADE MALHADA DE PRETO, EM AMBIENTE TROPICAL**, apresenta-se de acordo com as normas para publicação na

revista **Arquivo Latino Americano de Produção Animal**. Neste trabalho pretendeu-se empregar técnicas de marcadores genético-bioquímicos com estudo de proteínas possivelmente associados à ocorrência de mastite.

Referências

- ABE, T.; OISHI, T.; SUZUKI, S. Haemoglobin, transferrin and albumin variants in Formosan water buffalo. **Proc. Japan Acad.**, v. 45, p. 767-771, 1969.
- ASCHAFFERNBURG, R. Reviews of the progress of dairy science. **Journal Dairy Science.**, Champaign, v. 35, p. 447-460, 1968.
- ASCHAFFERNBURG, R.; DREWRY, J. Improved method for the preparations of crystalline beta- lactoglobulin and alpha- lactalbumin from cows milk. **Biochemistry**, Essex, v. 65, p. 237-277, 1957.
- ASCHAFFERNBURG, R.; DREWRY, J. Occurrence of different beta- lactoglobulins in cows milk. **Nature**, London, v. 176, p. 218-219, 1955.
- ASHTON, G. C. Beta-globulin alleles in some zebu cattle. **Nature**, v. 184, p. 1135-1136, 1959.
- ASHTON, G. C. Further β -globulin phenotypes in sheep. **Nature**, v. 182, p. 1101-1102, 1958.
- ASHTON, G. C. Serum albumin polymorphism in cattle. **Genetics**, v. 50, p. 1421-1426, 1964.
- BALANI, A. S.; RANJEKAR, P. K.; BARNABAS, J. Structural basis for genetic heterogeneity in haemoglobins of adult and new ruminants. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 24, p. 809-815, 1968.
- BANGHAN, A. D. Distribution of electrophoretically different haemoglobin among cattle breeds of Great Britain. **Nature**, v. 179, p. 467-468, 1957.
- BELL, K. One dimensional starch gel electrophoresis of bovine skim milk. **Nature**, London, v. 195, p. 705-06, 1962.
- BENHOLD, H. The transport function of blood serum proteins. In: PEETERS, H. **Protides of the biological fluids**. Amsterdam: Elsevier, 1962. p. 58-69.
- BLOCK, R. J.; WEISS, K.W. Studies on bovine whey proteins. IV the amino acid analyses of crystalline beta- lactoglobulins and Alpha- lactalbumin by quantitative paper chromatography. **Arch. Biochem. Biophys.**, Duluth, v. 55, p. 315-320, 1955.
- BORTOLOZZI, J. **Grupos sanguíneos e polimorfismo bioquímico em bovinos da raça Canchin**. Botucatu, 1979. 172 p. Tese (Livre-Docência em Genética). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 1979.

BORTOLOZZI, J.; PAGANINI, M.I.; MENDES, L.T. Metodologia usada no estudo dos sistemas polimórficos de bovinos. I Polimorfismo bioquímico. **Naturalia**, v. 7, p. 53-64, 1982.

BRAEND, M.; EFREMOV, G. Polimorphism of the cattle serum albumin. **Nord. Vet. Med.**, v. 17, p. 585-588, 1965.

BRAEND, M.; GASPARSKY, J. Hemoglobins and transferrins of european bison and their cattle hybrids. **Nature**, v. 214, p. 98 - 99, 1967.

CABANNES, R.; SERAIN, C. Hétérogenéité de l'hémoglobine des bovines: identification électrophorétique de deux hemoglobines bovines. **C. R. Soc. Biol.**, v. 149, p. 7-17, 1955.

CHARLWOOD, P. A. Ultra centrifugal studies of rat rabbit and guinea pig serum albumins. **Biochem J.**, v. 78, p. 163-171, 1961.

CIFRIAN, E. A. J.; MARQUARDT, W. W.; Role on milk fraction, serum, and divalent cations in protection of mammary epithelial cells of cows against damage by Staphylococcus aureus toxins. **American Veterinary Journal**, v.57, n. 3, p.308-312, 1996.

COLDITZ, I. G.; WATSON, D. L. The immunophysiological logical basis for vaccinating ruminants against Mastitis. **Australian Veterinary Journal**, v. 62, n. 5, p. 145-152, 1985.

DEL LAMA, S. N. ; ZAGO, M. A. A importância da genotipagem nos locos das proteínas do leite para a seleção leiteira do rebanho brasileiro. In: **Anais do XXXII Reunião da SBZ** – 1995. p. 655-656.

DETILLEUX, J. C.; Genetic factors affecting susceptibility of dairy cows to udder pathogens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 88, p. 103-110, 2002.

GIESECKE, W.H.; OSTERHOFF, D. R. The significance of milk protein phenotyping in the prevention of septic bovine mastitis and the improvement of friesland dairy. **Animal Blood Groups Biochemical Genetics. Wageningen**, v. 5, n. 1, p. 35, 1986.

HARGROVE, G. L.; KIDDY, C. A.; YOUNG, C. W.; HUNTER, A. G.; TRIMBERGER, G.W.; MATER, R. E. Genetic polymorphism of blood and milk and reproduction in Holstein cattle. **J. Dairy Sci.**, v. 63, p.1154-1166, 1980.

HOLMERG, C. G.; , LAURELL, C. B. Studies on the capacity of serum to bind iron. A contribution to our knowledge of the regulation mechanism of serum iron. **Acta Physiol. Scand.**, v. 10, p. 307-319, 1945.

KANEKO, J. J.; CORNELIUS, C. E. **Clinical biochemistry domestic animals**. v.1. 2. ed. New York: Academic Press, 1970, p. 97-110.

KHANNA, N.D. **Biochemical polymorphism and blood groups in indian buffaloes.** Oslo, 154 p.(PhD) Thesis. Norges Veterinaerhogskall,1973.

LARSEN, B.; THYMANN, M. Studies on milk protein polymorphism in danish cattle and the interaction of the controlling genes. **Acta Veterinary Scandian.**, v. 7, p. 1890-1205, 1966.

McKENZIE, H. A. Milk proteins. **Protein Chemical.** v. 22, p. 55-234, 1967.

MORTON, N. E. Forces maintaining polymorphism. **Acta Anthropogen.** v. 1, p. 3-14, 1976.

OSTERHOFF, D. R.; HEERDEN, J. A. H. Transferrin types in South African cattle breeds. In: European Animal Blood Conference. 9, 1964, **Proceedings.** Prague, 1964. p. 301-307.

OSTERHOFF, D. R.; NEETHLING, L. P. Recent studies on cattle: transferrin. **J. S. Afr. Anim. Prod.**, v. 40, p. 75-80, 1969.

OSTERHOFF, D. R.; YOUNG, E.; WARDCOX, I. S. A study of genetic blood variants in African buffaloes. **J.S. Afr. Vet. Med. Assoc.**, v. 41, p. 33-37, 1970.

PALMER, A. H. The preparation of a crystalline globulin from the albumin fraction of cows milk. **Journal Biology Chemical.** v. 104, p.359-372, 1934.

PAULING, L.; ITANO, H.A, SINGER, S.J., WELLS, I.C. Sickle cell anemia, a molecular disease. **Science**, v. 110, p. 543, 1949.

PUTNAM, F. W. Structure and Function of the Plasma Proteins. In: NEURATH, H. [s.n.]. **The Proteins.** v.3. New York: Academic Press, 1965. , p. 154-253.

RAMOS, P.R.R. **Grupos sangüíneos, polimórficos e bioquímicos das hemoglobinas em búfalos.** Botucatu, 173 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista,1986.

RAMOS, P. R. R. Possíveis associações entre polimorfismos bioquímicas e características de interesse zootécnico. In: **Encontro sobre aplicações da eletroforese na agropecuária**, 4, 1992. São Paulo: Instituto Biológico, 1992. p. 17-25.

ROSE, D.; BRUNER, J. R.; KALAN, E. B. Nomenclature of the proteins of cows milk. Third revision. **Journal Dairy Science.**, v. 53,n. 1,p. 1-17, 1970.

SARTORE, G.; BERNOCO, D. Research on biochemical polymorphism in the indigenous cattle Piemont. In: **European Conference on Blood Groups and Biochemical Polymorphism.**, 10, 1966, Paris, 1966. p. 283-287.

SCHROEDER, W. A.; SHELTON, J. R.; ROBERTSON, B.; BABIN, D. R. A comparison of aminoacid sequence in the chains of adult bovine haemoglobins A and B **Archs. Biochem. Biophys.**, v. 120, p. 124-136, 1967.

- SCHWELLNUS, M.; GUÉRIN, G. Difference between the HbC variants in brahman and indigenous southern african cattle breeds. **Anim. Blood Groups Biochem. Genet.**, v. 8, p. 161-169, 1977.
- SHADE, A. L.; CAROLINE, L. An iron binding component in human blood plasma. **Science**, v. 104, p. 340-341, 1946.
- SINGH, H.; BHAT, P.N.; SINGH, R. Association of protein polymorphic genotypes with certain performance traits in cross bred cattle. Indian **Journal Animal Science**. v. 51, n. 1, p. 5-10, 1981.
- SMITH, E. L.; HILL, R. L.; LEHMAN, R.; LEFKOWISTY, R.J.; HANDLER, P.; WHITE, A. **Bioquímica: mamíferos**. 7. ed. Guanabara Koogan , 1983, 620 p..
- SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels. *Biochemistry*, v. 61, p. 6222-6241. 1955.
- SOOS, P.; HORVÁTH, I.; SOLYOM, P. Red cell carbonic anhydrase polymorphism of buffalo (*Bubalus bubalis*, L.). **Acta Vet. Acad. Sci. Hung.**, v. 21, p. 413-415, 1971.
- SORDILLO, L. M.; SHAFER-WEAVER, K.; DE ROSA, D. Immunobiology of the mammary gland. **Journal of Dairy Science**. v. 80, p.1851-1865, 1997.

CAPÍTULO 2

**POSSÍVEIS ASSOCIAÇÕES ENTRE MARCADORES GENÉTICO-BIOQUÍMICOS E
SENSIBILIDADE A MASTITE EM VACAS DA RAÇA HOLANDÊS, PURA POR
CRUZAMENTO, VARIEDADE MALHADA DE PRETO, EM AMBIENTE TROPICAL**

**POSSÍVEIS ASSOCIAÇÕES ENTRE MARCADORES GENÉTICO-BIOQUÍMICOS E
SENSIBILIDADE A MASTITE EM VACAS DA RAÇA HOLANDÊS, PURA POR
CRUZAMENTO, VARIEDADE MALHADA DE PRETO, EM AMBIENTE TROPICAL**

Resumo

A mastite é um processo inflamatório da glândula mamária, aguda ou crônica, freqüente em ruminantes, sendo consideráveis as perdas econômicas por tal patologia, por desencadear inúmeros problemas sanitários para a pecuária leiteira. Portanto, a análise do polimorfismo dessas proteínas constitui-se numa importante ferramenta para o melhoramento genético do rebanho leiteiro. Neste trabalho, foram analisadas possíveis associações entre o polimorfismo bioquímico das hemoglobinas, transferrinas, albuminas séricas e beta lactoglobulinas e freqüência de mastite em vacas da raça Holandês, num rebanho controlado, mantidas em ambiente tropical. Embora não tenha sido constatada diferença significativa entre as freqüências de polimorfismo bioquímico das proteínas entre as duas populações estudadas, propõe-se a realização de novos estudos na área de biologia genética para que os dados que forem obtidos poderão ser empregados na orientação de programas de manejo e de melhoramento com vistas à resistência a mastite.

**POSSIBLE ASSOCIATIONS BETWEEN GENETIC-BIOCHEMICAL MARKERS AND
SENSIBILITY MASTITIS IN COWS OF THE DUTCH RACE, PURE FOR CROSSING,
MAILED VARIETY OF BLACK, IN TROPICAL ATMOSPHERE**

Abstract

Mastitis is an inflammatory process of the mammary gland, sharp or chronic; frequent in ruminant, being considerable the economical losses for such pathology, for unchaining countless sanitary problems for the livestock milk pan. Therefore, the analysis of polymorphism of those proteins is constituted of an important tool for the flock milkman's genetic improvement. In this work, possible associations were analyzed among the biochemical polymorphism of the hemoglobins, transferrins, serum albumins and beta lactoglobulins and mastitis frequency in cows of the Dutch race, in a controlled flock, maintained in tropical atmosphere. Although it has not been verified significant differences among the frequencies of biochemical polymorphism of the proteins among the two studied populations, intends the accomplishment of new studies in the area of genetic biology so that the data that be obtained can be used in the orientation of handling programs and of improvement with views to the resistance the mastitis.

Introdução

A mastite é um processo inflamatório da glândula mamária, aguda ou crônica, e de grande importância num rebanho leiteiro pela diminuição significativa que provoca na produção de leite. A redução do custo de mastite bovina é necessária para manter os produtores leiteiros economicamente competitivos e o custo dos produtos lácteos razoável. Entretanto, os métodos atuais para reduzir a incidência de mastite contam com medidas profiláticas e terapêuticas que não são totalmente efetivos. Este é o motivo pelo qual outros métodos de controle são necessários, e uma abordagem é melhorar a resistência genética natural das vacas a patógenos do úbere (DETILLEUX, 2002).

Devido ao grande número de casos subclínicos, o diagnóstico depende amplamente de testes indiretos, que, por sua vez, dependem do conteúdo de leucócitos do leite. As perdas econômicas pela mastite são totais, causando diminuição na qualidade e da produção de leite, gastos com medicamentos, assistência técnica e reposição de animais. Diversas estratégias de melhoramento animal aliadas ao desenvolvimento de técnicas de genética molecular, resultaram em aumento da produção e modificação da composição do leite, melhorando sua qualidade (DEL LAMA e ZAGO, 1995).

O polimorfismo das proteínas do leite pode estar relacionado com produção, composição, e qualidade do leite. Assim sendo, a identificação de marcadores genéticos bioquímicos tem ampla aplicação em programas de seleção.

A partir da descoberta do polimorfismo bioquímico de proteínas, um grande interesse surgiu na tentativa de se verificar possíveis associações entre os diferentes tipos de proteínas e características de produção e reprodução animal.

Vários estudos eletroforéticos têm sido realizados para se detectar associações entre genes, considerados marcadores genéticos, e características de interesse zootécnico, além de caracteres adaptativos e econômicos. Tais associações também são de grande valia para o estudo da origem, evolução, estrutura, adaptação e programas de seleção (DOSTAL, 1970; SINGH; BHAT; SINGH, R., 1981).

Além disso, para estudo de melhoramento animal, é importante o conhecimento da relação genética existente entre as diversas raças. Os marcadores genéticos bioquímicos são considerados ferramentas úteis para os melhoristas, pois, além de fornecer subsídios para o cálculo da distância genética, podem estar associados a características desejáveis do ponto de vista zootécnico (RAMOS, 1992).

As duas variantes de hemoglobinas encontradas nos bovinos foram primeiramente descritas por Cabannes e Serain (1955). O tipo mais comum (HbA) é identificado por uma zona eletroforética de migração lenta e o outro tipo menos freqüente, caracterizada por uma zona eletroforética que migra com maior rapidez (HbB). Os animais heterozigotos apresentam as duas zonas, sendo, portanto um caso de codominância.

Khanna (1973) mostrou que o polimorfismo da hemoglobina apresenta três fenótipos: AA, BB e AB, os quais estão presentes nas raças zebu indianas. A hemoglobina B está em alta freqüência nas raças indianas, podendo ser considerada como uma prova de adaptação genética ao meio ambiente e estar correlacionada à tolerância ao calor, taxas metabólicas e resistência a doenças.

Larsen e Thymann (1966) investigaram o polimorfismo da hemoglobina por eletroforese horizontal em gel de amido testando amostras de 2067 animais das raças Gir, Guzerá, Nelore, Indubrasil e Tabapuã, os quais exibiram alta freqüência dos alelos HbA e HbB, indicando que as populações estão em equilíbrio genético.

Ashton (1959), Osterhoff e Heerden (1964) e Osterhoff e Neethling (1969) postularam que as raças apresentando o alelo Tf^E em alta freqüência, caracterizariam animais com boa resistência ao estresse climático e, assim, indivíduos homozigotos Tf^E seriam mais resistentes ao calor que os homozigotos Tf^A e Tf^D ; por outro lado, os genótipos Tf^D/Tf^E e Tf^E/Tf^E estariam correlacionados com pouco ganho de peso e baixo coeficiente de conversão alimentar (OSTERHOFF ; NEETHLING, 1969).

Pelo menos 10 alelos autossômicos codominantes, foram descritos em bovinos, a saber: Tf^H , Tf^{A1} , Tf^{A2} , Tf^B , Tf^{D1} , Tf^{D2} , Tf^F , Tf^N , Tf^E e Tf^G , de acordo com a mobilidade eletroforética, em ordem decrescente, em gel de amido, sendo EE e DE os mais freqüentes (SINGH ; BHAT; SINGH, 1981).

O polimorfismo da albumina foi detectado inicialmente por Ashton (1964) e Braend e Efremov (1965) que descreveram duas bandas distintas denominadas AlbA e AlbB, controladas por dois genes autossômicos codominantes. Posteriormente, outros tipos de albuminas foram identificados: G, D, E, F (Zâmbia), C e X, sendo os alelos denominados por Alb^A e Alb^B e de Alb^F e Alb^S . Soos (1971) estudando uma raça de gado húngaro, descobriu um novo fenótipo de albumina, que denominou de AlbH9.

De acordo com Putnam (1965) 43% das proteínas séricas de bovinos são constituídas de albuminas, umas das proteínas de maior mobilidades eletroforética. Kaneko e Cornelius (1970) verificaram que, quando um animal fica doente, geralmente a

alteração mais acentuada é a da fração de albumina. Segundo esses autores, o nível das proteínas plasmáticas em um animal normal é também um perfil relativamente constante, e essa constância é controlada geneticamente.

Além das variantes A e B, outros dois componentes de menor mobilidade foram encontrados; a fração com mobilidade um pouco menor que a fração B foi chamada de C uma vez que os autores presumiram ser esta a variante descrita por Bell (1962), e o componente mais lento foi chamado D

Giesecke e Osterhoff (1986) estudaram 796 vacas da raça Friesland de oito rebanhos comerciais na África do Sul. Observaram que a herança da resistência ou da susceptibilidade à mastite séptica, diferia quanto ao fenótipo de beta-lactoglobulinas. Havia um aumento significativo de indivíduos resistentes à mastite com genótipos heterozigotos para o loco citado.

Desta forma, no presente trabalho pretendeu-se empregar técnicas de Marcadores Genético Bioquímicos com estudo de proteínas possivelmente associados à ocorrência de mastites.

Material e Métodos

Foram utilizadas 60 vacas da raça Holandês, do rebanho da Fazenda Água Limpa, da UNIMAR, localizada no município de Marília, estado de São Paulo. O rebanho em estudo tem um eficiente controle zootécnico referente à ascendência, parentesco, controle higiênico-sanitário e produção. Os animais constituíram dois grupos, resistentes e sensíveis, sendo que no primeiro há animais isentos de infecção nas mamas e no segundo animais portadores de infecção e/ou com histórico prévio registrado.

As amostras de sangue e leite colhidas foram analisadas no Laboratório de Fracionamento de Proteínas do Departamento de Física e Biofísica do Instituto de Biociências (IB).

Amostras de 10 ml de sangue foram coletadas da veia jugular, de cada animal, e acondicionadas em tubo estéril com anticoagulante. Durante o transporte do local da coleta até o laboratório, as amostras foram mantidas sob refrigeração.

As amostras de leite foram obtidas pela ordenha parcial das vacas no período da tarde (segunda ordenha), em frascos estéreis de 50 mL. Posteriormente as amostras sofreram refrigeração e foram transportadas ao Laboratório de Fracionamento de Proteínas, para posterior processamento.

A técnica de processamento da hemoglobina teve a finalidade de obter um sobrenadante formado principalmente de hemoglobinas destomatizadas, uma fase intermediária composta por membranas celulares e um fundo contendo clorofórmio.

Quando da utilização das amostras de plasma sanguíneo (transferrina e albumina sérica), estas foram descongeladas à temperatura ambiente, submetidas à dosagem de proteínas pelo método de biureto (VILLELA; BACILA; TASTALD, 1973), subdivididas em alíquotas e acondicionadas em frascos de 1,5 ml, para maior facilidade de manipulação.

As amostras de leite foram submetidas a uma acidificação com ácido acético 10%, até pH 4.7, havendo assim a precipitação da caseína. Após a coagulação da caseína, as amostras de leite foram submetidas à centrifugação em centrífuga refrigerada (COLDITZ; WATSON, 1985) a 3000 G durante 15 minutos. O sobrenadante, foi filtrado e mantido em congelador, em frascos tipo *ependorf*, para posterior emprego na identificação dos fenótipos das Beta lactoglobulinas.

A dosagem das proteínas plasmáticas foi realizada pela reação de biureto. A absorbância foi medida em 540 nm empregando-se um Espectrofotômetro Ultrospec 2000 da Pharmacia Biotech e depois calculada a quantidade de proteína de cada amostra de soro pela interpolação do resultado numa curva de calibração previamente construída.

A corrida eletroforética em gel de ágar-amido foi realizada imediatamente após a extração e purificação das amostras. A corrida eletroforética foi feita em cuba horizontal contendo solução tampão Borato pH 8,6. A cuba de eletroforese foi conectada a uma fonte (EPS 600 – Pharmacia – Biotech) programada nas seguintes condições: 100V, 100W, 30mA. O tempo de corrida foi de sessenta minutos.

As imagens obtidas foram armazenadas em sistema de fotodocumentação, VDS – Pharmacia, empregando o programa computacional Image Master – VDS – Pharmacia.

Para a determinação dos padrões eletroforéticos das proteínas do plasma sanguíneo (transferrinas e albuminas) e da beta-lactoglobulina, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida vertical, alcalina (pH 8,3), em sistema descontínuo de tampões alcalinos, descrita por Hames e Rickwood (1990) e Gahne; Juneja; Groumus. (1986), empregando-se o gel de empilhamento na concentração de 4% e o gel de separação na concentração de 11%.

As soluções 1, 3, 4, H₂O deionizada e TEMED descritas no Anexo A, foram misturadas nas proporções descritas no Anexo B para a concentração desejada, num volume total de 20 mL.

As soluções 1, 2, 5, H₂O deionizada e TEMED, descritas no Anexo A, foram misturadas nas proporções indicadas no Anexo B para obtenção da concentração desejada, totalizando 20 mL de solução, estocada a 4°C.

A eletroforese foi realizada em corrida constante, mantendo inicialmente a diferença de potencial de 100 V com 10 mA, até que o indicador azul de bromofenol, atinja o gel de separação. Em seguida a voltagem foi elevada para 250 V com cerca de 25 mA. O tempo total de corrida foi de 8:30 horas e realizada sob refrigeração (4°C).

Após o término da corrida eletroforética os géis foram cuidadosamente removidos dos moldes de vidro e mergulhados em solução fixadora por 20 minutos e solução descorante por 2 minutos. Em seguida, os géis foram corados com solução corante Comassie Blue R 250, em banho-maria a 60°C, por 10 minutos e descorados com solução descorante, por 40 minutos, renovando-se a solução após os primeiros 20 minutos, conforme técnica descrita em ACRILAMIDE §.d.]. Após a descoloração, os géis foram mantidos em solução conservante até a desidratação (ANEXO C)

Para hidratação, os géis foram imersos em solução de ácido acético a 7%, glicerina a 10% e água destilada. A seguir, foi feita a desidratação para estocagem dos géis.

As placas desidratadas digitalizadas através do Image Máster VDS – Pharmacia LKB, foram comparadas com eletroferogramas disponíveis na literatura e submetidas à contraprova, adotando o critério da mobilidade eletroforética relativa, com amostras do Banco de Proteínas do Laboratório de Eletroforese do Departamento de Física e Biofísica, IB, UNESP de Botucatu.

Para as análises estatísticas, os animais foram separados em dois blocos sendo caracterizados como duas populações. A população P1, formada por vacas que nunca apresentaram mastite (Grupo Resistente) e a população P2, por vacas de terceira a quinta lactação, que sempre apresentam mastite (Grupo Sensível). As análises levaram em consideração a ocorrência determinados alelos que, se tiverem alguma relação com a ocorrência de mastites, suas frequências diferenciarão as populações em questão. O programa computacional TFPGA (Tools for Population Genetis Analsys) foi empregado para as análises de Estatística Descritiva Populacional, calculando as frequências alélicas e os graus de heterozigosidade, Equilíbrio de Hardy-Weinberg e o teste de χ^2 simultâneo para testar uma possível associação do conjunto dos locos em estudo com a ocorrência de mastite.

Resultados

Neste trabalho foram encontrados dois padrões eletroforéticos de hemoglobinas; um apresentando apenas uma banda lenta, sendo os animais portadores desse padrão considerados homozigotos A, e o segundo, representado por apenas uma vaca que apresentou duas bandas, sendo a segunda banda (banda B) mais rápida, sendo este animal considerado heterozigoto (Figura 1). As frequências alélicas estão apresentadas na Tabela 1.

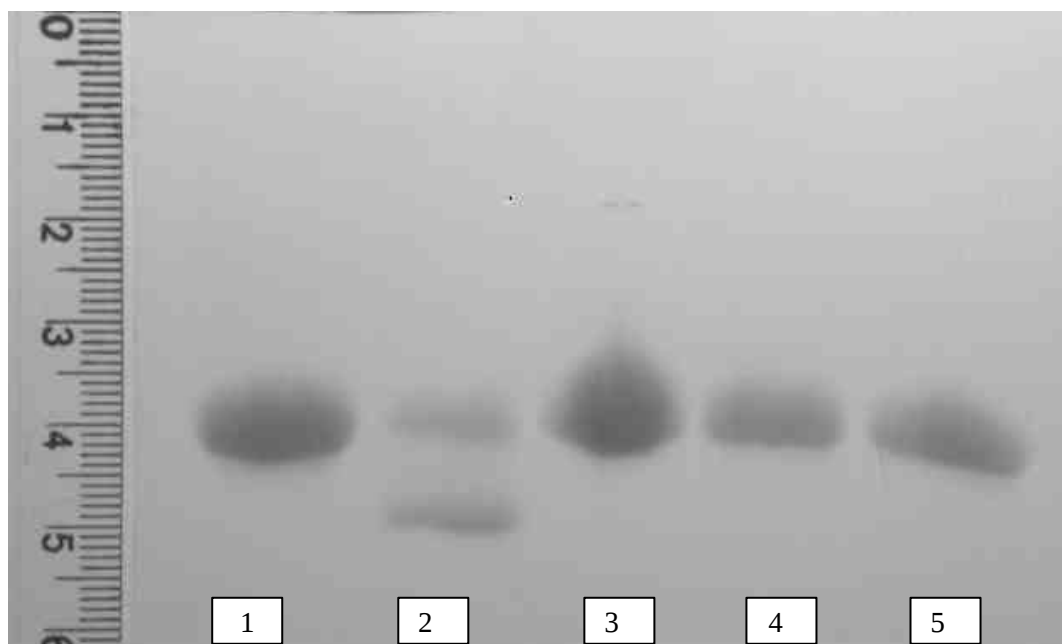


Figura 1: Padrões eletroforéticos de hemoglobinas obtidos em gel de Ágar –amido, num sistema descontínuo de tampões alcalinos. A amostra 2 representa uma vaca heterozigota AB. As demais aplicações representam vacas homozigotas AA.

Tabela 1 Freqüências alélicas e genóticas de Hemoglobinas em vacas da raça Holandês, variedade preto e branco, separadas por grupos: 1 resistente à mastite e 2, sensível.

População	Alelos	Freqüências	Genótipos	Freqüências
1 Resistentes	A	0.9833	AA	0.9668
	B	0.0167	AB	0.0328
			BB	0.0000
2 Sensíveis	A	1.0000	AA	1.0000
	B	0.0000	AB	0.0000
			BB	0.0000

Grau de heterozigosidade Pop1: 0.0328

As transferrinas apresentaram, no rebanho em estudo, três alelos diferentes, os quais codificam três bandas de proteínas cada um, migrando na região das Beta-globulinas, porção intermediária do gel.

De acordo com a literatura consultada, o alelo A apresenta a menor mobilidade relativa, sendo o alelo D de mobilidade intermediária e o alelo E o de maior mobilidade.

Foram encontrados os seguintes fenótipos nas populações em questão: DD, AE, DE e EE (Figura 2), sendo que as freqüências relativas, bem como suas freqüências alélicas se encontram na Tabela 2.

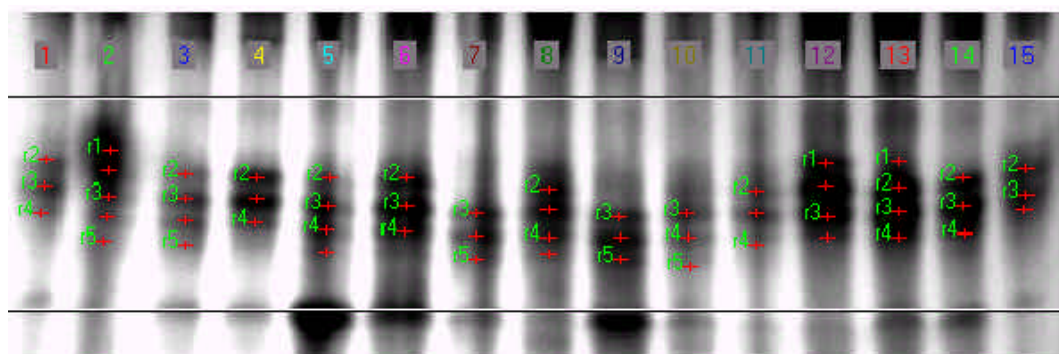


Figura 2: Padrões eletroforéticos de Transferrinas obtidos em gel de Poliacrilamida com 10% de concentração no gel separador, num sistema descontínuo de tampões alcalinos. As amostras 1, 4, 6, 13 e 15 representam vacas homozigotas DD; as amostras 2, 11 e 12 representam vacas heterozigotas AE; as amostras 3, 5 e 8

representam vacas heterozigotas DE e as amostras 7, 9 10 e 14 representam vacas homozigotas EE.

Tabela 2 Freqüências alélicas e genótípicas de Transferrinas em vacas da raça Holandês, separadas por grupos: 1 resistente à mastite e 2, sensível.

População	Alelos	Freqüências	Genótipos	Freqüências
1 Resistentes	A	0.0500	DD	0.4225
	D	0.6500	AE	0.0300
	E	0.3000	DE	0.3900
			EE	0.0900
2 Sensíveis	A	0.0167	DD	0.3803
	D	0.6167	AE	0.0122
	E	0.3667	DE	0.4523
			EE	0.1345

Grau de heterozigosidade Pop1: 0.4850

Pop2: 0,4850

As amostras de albumina, no rebanho em estudo se mostraram monomórficas, só apresentando um tipo de albumina, sendo as vacas consideradas homozigotas A, como demonstrado na Figura 3.

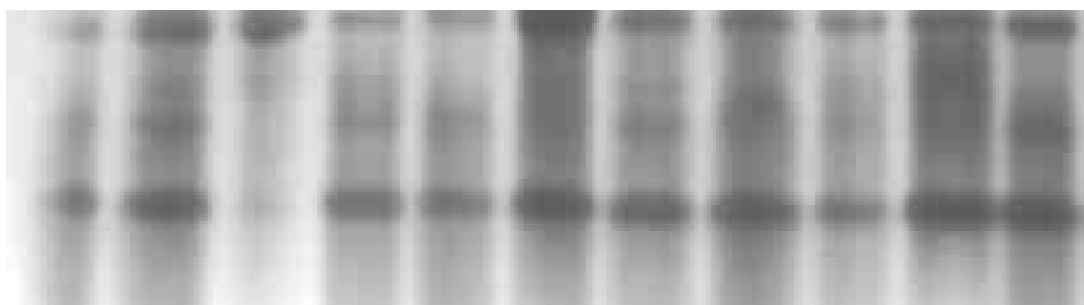


Figura 3: Padrões eletroforéticos de Albumina obtidos em gel de Poliacrilamida com 10% de concentração no gel separador, num sistema descontínuo de tampões alcalinos. Todas as amostras representam vacas homozigotas AA.

As Beta lactoglobulinas apresentaram no rebanho em estudo a ocorrência de três padrões eletroforéticos.

Observou-se que a maioria dos animais das populações 1 e 2 apresentou bandas AB, sendo considerados heterozigotos. A seguir observou-se maior ocorrência das bandas BB, seguidas das bandas AA, sendo estes homozigotos (Figura 4). As freqüências alélicas estão apresentadas na Tabela 3.

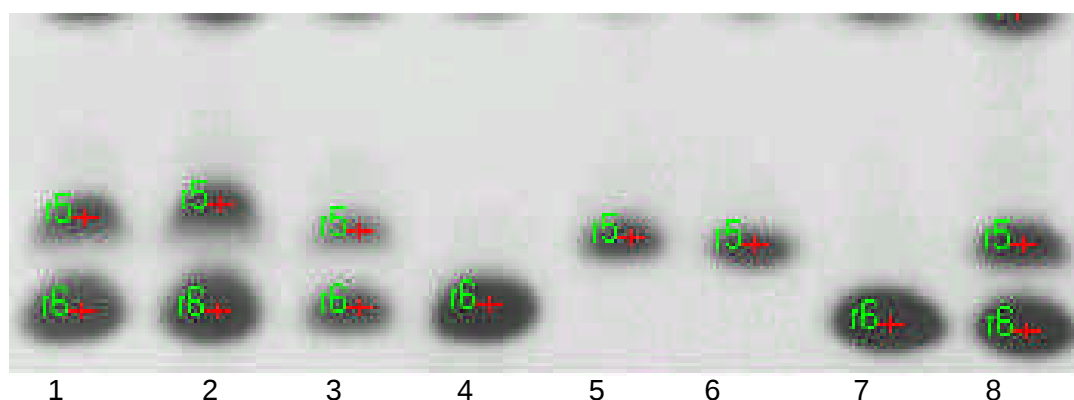


Figura 4: Padrões eletroforéticos de Beta lactoglobulinas obtidos em gel de poliacrilamida com 10% de concentração no gel separador, num sistema descontínuo de tampões alcalinos. As amostras 1, 2, 3 e 8 representam vacas heterozigotas AB, as amostras 4 e 7 representam vacas homozigotas BB e as amostras 5 e 6 representam vacas homozigotas AA.

Tabela 3 Freqüências alélicas e genótípicas de Beta lactoglobulinas em vacas da raça Holandês, separadas por grupos: 1 resistente à mastite e 2, sensível.

População	Alelos	Freqüências	Genótipos	Freqüências
1 Resistentes	A	0.5167	AB	0.4994
	B	0.4833	AA	0.2669
			BB	0.2335
2 Sensíveis	A	0.4333	AB	0.4911
	B	0.5667	AA	0.1877
			BB	0.3211

Grau de heterozigosidade Pop1: 0.4994

Pop2: 0.4911

Para o efeito de análise de uma possível influência do conjunto dos locos estudados sobre a ocorrência de mastites, foi calculado o χ^2 na análise simultânea das populações.

O resultado obtido foi de $\chi^2 = 2,7425$, com 6 graus de liberdade, $p = 0,8404$; portanto não significativo.

Discussão

Em nosso estudo as variações encontradas para as hemoglobinas, em bovinos, foram semelhantes às descritas por Cabannes e Serain (1955), em que se pode observar as ocorrências de duas variantes hemoglobínicas, denominadas de HbA e HbB, que diferem entre si pela velocidade de migração, quando submetidas a eletroforese.

Khanna (1973) demonstrou que os polimorfismos das hemoglobinas apresentam três fenótipos: A, B e AB, em raças zebu-indianas, revelando que a hemoglobina B pode ter uma correlação com resistência a doenças. Estes dados diferem para os fenótipos encontrados em nosso trabalho, em que as vacas européias não apresentaram o mesmo resultado, sendo que a maioria das vacas apre-

Nossos dados diferem daqueles citados por Larsen e Thymann (1966) que investigaram o polimorfismo da hemoglobina por eletroforese em gel de amido, em 2067 animais das raças Gir, Guzará, Nelore, Indubrasil e Tabapuã, e observaram que estes animais exibiram elevada freqüência dos alelos HbA e HbB, indicando que as populações estão em equilíbrio genético.

Com relação a transferrina, nossos dados revelaram a existência de somente três alelos, A, D, e E. Observou-se maior ocorrência dos alelos D e E, tanto nos animais da população 1 quanto da população 2. Nossos dados estão parcialmente de acordo com aqueles citados por Singh; Bhat e Singh, R. (1981) que pesquisando a transferrina em soro de vacas, encontraram como fenótipos mais freqüentes EE e DE.

Apesar de inexistirem dados na literatura relacionando a ocorrência de mastite com a freqüência de aparecimento dos alelos da transferrina, pode-se considerar que animais que apresentam o alelo D estão relacionados a maior produção leiteira como citado por Larsen e Thymann (1966).

Osterhoff e Heerden (1964) caracterizaram que as raças bovinas que possuíam alta tolerância climática apresentaram maior frequência do alelo E, e concluíram que pode existir uma associação entre o alelo D e a produção de leite e o alelo A para ganho de peso; o que pode ser a possível explicação para as frequências de transferrinas encontradas neste trabalho, pois os animais utilizados têm histórico de alta produção de leite.

Ashton (1964) e Braend e Efrenov (1965) descreveram duas bandas distintas em bovinos denominadas de AlbA e AlbB. Em nosso estudo de polimorfismo genético das albuminas pode-se observar diferença entre as literaturas citadas onde se encontrou em todas as amostras apenas a banda A, sendo esses animais homozigotos e monomórficos.

Kaneko e Cornelius (1970) verificaram que quando os animais apresentam-se doentes, a alteração mais acentuada é a da fração da albumina, e dentro dos nossos estudos a população 2 apresentaram animais com metabolismo alterado (mastite), e na população 1 animais sadios, não tendo diferenças nas amostras avaliadas de concentração de albumina.

Com relação à beta-lactoglobulina, os bovinos pesquisados em nosso experimento apresentaram os tipos A, B e AB, o que contradiz com os dados de Bell (1962), em que foram encontrados os fenótipos C e D. A beta-lactoglobulina D apresenta mobilidade em gel mais lenta, e a tipo C apresenta mobilidade intermediária entre D e B.

De acordo com Giesecke e Osterhoff (1986), animais que possuem genótipos heterozigotos têm maior resistência ao desenvolvimento da mastite, visto que há uma correlação entre a herança e susceptibilidade à mastite de acordo com o fenótipo da beta-lactoglobulina. Em nosso estudo, observou-se que os animais da população 1 (resistentes) apresentaram maior frequência de heterozigose quando comparados com os animais da população 2 (sensíveis), apesar de não haver diferença significativa entre os grupos populacionais, considerando a estatística. Estes dados nos permitem discutir a importância da caracterização eletroforética da beta-lactoglobulina para identificação de animais susceptíveis à mastite.

Conclusões

De acordo com as condições em que foi realizado este estudo, pode-se verificar que:

- não existe relação entre os níveis sanguíneos de hemoglobina, transferrina e albumina com a ocorrência de mastite em bovinos da raça Holandês;
- a caracterização eletroforética da beta-lactoglobulina no soro lácteo pode se tornar uma medida útil na identificação de animais susceptíveis ou não à mastite, se acompanhada de métodos laboratoriais de caracterização eletroforética;
- a escassez de dados científicos referentes à importância dos marcadores genético-bioquímicos das proteínas no desenvolvimento da mastite não nos permitiu a obtenção de análises comparativas do rebanho em estudo;
- mais estudos devem ser realizados no campo do melhoramento genético para que se possa identificar os marcadores genético-bioquímicos que tenham correlação com a ocorrência de mastite no rebanho leiteiro.

Referências

- ASHTON, G.C. Beta-globulin alleles in some zebu cattle. **Nature**, v. 184, p. 1135-6, 1959.
- ASHTON, G.C. Serum albumin polymorphism in cattle. **Genetics**, v. 50, p. 1421-6, 1964.
- BELL, K. One dimensional starch gel electrophoresis of bovine skim milk. **Nature**, London, v. 195, p. 705-06, 1962.
- BRAEND, M., EFREMOV, G. Polymorphism of the cattle serum albumin. **Nord. Vet. Med.**, v. 17, p. 585-8, 1965.
- CABANNES, R., SERAIN, C. Hétérogénéité de l'hémoglobine des bovines: identification électrophorétique de deux hémoglobines bovines. **C. R. Soc. Biol.**, v. 149, p. 7-17, 1955.
- COLDITZ, I. G., WATSON, D.L. The immunophysiological logical basis for vaccinating ruminants against Mastitis. **Australian Veterinary Journal**. v. 62, n.5, p. 145-52, 1985.
- DEL LAMA, S.N. & ZAGO, M.A. A importância da genotipagem nos locos das proteínas do leite para a seleção leiteira do rebanho brasileiro. **Anais do XXXII Reunião da SBZ** – 1995. p. 655-56.
- DETILLEUX, J.C., Genetic factors affecting susceptibility of dairy cows to udder pathogens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 88, p.103-10, 2002.
- DOSTAL, J. **Polymorphism in bovine blood and milk proteins and their association with milk production**. Minesota, 1970. Tese - Faculty of the Graduate School of the University of Minesota.
- GAHNE, B., JUNEJA, R.K., GROUMUS, J. Horizontal polyacrylamide gradient gel electrophoresis for the simultaneous phenotyping of transferrin, post-transferrin, albumin and post-albumin in the blood plasma of cattle. **Animal Blood Groups Biochemical Genetic**. v.5, n.1, p.35, 1986.
- GIESECKE, W.H., OSTERHOFF, D.R. The significance of milk protein phenotyping in the prevention of septic bovine mastitis and the improvement of Friesian dairy. **Animal Blood Groups Biochemical Genetics. Wageningen**, v. 5, n.1, p.35, 1986.
- HAMES, B.D., RICKWOOD, D. **Gel electrophoresis of proteins**. 2^a ed. New York: Oxford University Press. 1990. 383 p.
- KANEKO, J.J., CORNELIUS, C.E. **Clinical biochemistry domestic animals**. 2. ed. New York: Academic Press, 1970. v.1, p. 97-110.

- KHANNA, N.D. **Biochemical polymorphism and blood groups in indian buffaloes.** Oslo, 1973. 154 p. PhD Thesis. Norges Veterinaerhogskall.
- LARSEN, B., THYMANN, M. Studies on milk protein polymorphism in danish cattle and the interaction of the controlling genes. **Acta Veterinary Scandian.**, v. 7,p. 189-1205,1966.
- OSTERHOFF, D.R., HEERDEN, J.A.H. Transferrin types in South African cattle breeds. In: EUROPEAN ANIMAL BLOOD CONFERENCE. 9, 1964, **Proceedings.** Prague, 1964. p. 301-7b.
- OSTERHOFF, D.R., NEETHLING, L.P. Recent studies on cattle: transferrin. **J. S. Afr. Anim. Prod.**, v. 40, p. 75-80, 1969.
- PUTNAM, F.W. Structure and Function of the Plasma Proteins. In: NEURATH, H. [s.n.]. **The Proteins.** New York: Academic Press, 1965. v. 3, p. 154-253.
- RAMOS, P.R.R. Possíveis associações entre polimorfismos bioquímicas e características de interesse zootécnico. In: **Encontro Sobre Aplicações da Eletroforese Na Agropecuária**, 4, 1992. São Paulo: Instituto Biológico, 1992. p. 17-25.
- SINGH, H., BHAT, P.N., SINGH, R. Association of protein polymorphic genotypes with certain performance traits in cross bred cattle. **Indian Journal Animal Science.** v. 51, n.1, p.5-10, 1981.
- SOOS, P., HORVÁTH, I., SOLYOM, P. Red cell carbonic anhydrase polymorphism of buffalo (*Bubalus bubalis*, L.). **Acta Vet. Acad. Sci. Hung.**, v. 21, p. 413-5, 1971.
- VILLELA, G.G., BACILA, M., TASTALDI, H. **Técnicas e Experimentos de Bioquímica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1973. 552p.

Anexos

Anexo A – Tabela das fórmulas das soluções estoque para o preparo do meio suporte (géis espaçador e separador) e da solução tampão eletrodo.

CÓDIGO	COMPONENTES	QUANTIDADE	PH
1	Acrilamida	30,0 g	
	BIS	0,8 g	
	H ₂ O	q.s.p. 100 mL	
2	HCl 1N	48,0 mL	
	TRIS	6,00 mL	6,8
	TEMED	0,46 mL	
	H ₂ O	q.s.p. 100 mL	
3	HCl 1N	48,0 mL	
	TRIS	36,6 mL	8,8
	TEMED	0,23 mL	
	H ₂ O	q.s.p. 100 mL	
4	Persulfato de Amônio	1,50 g	
	H ₂ O	q.s.p. 100 mL	
5	Riboflavina	0,004 g	
	H ₂ O	q.s.p. 100 mL	
6*	TRIS	6,0 g	8,3
	Glicina	28,8 g	
7	H ₂ O		

- Diluir 1:10 antes do uso

TRIS - Tris (hidroximetil) aminometano (SIGMA Chemical Company)

TEMED - N, N, N', N' - tetrametilenodiamina (SIGMA Chemical Company)

BIS - N, N'- metileno - bis - acrilamida (SIGMA Chemical Company)

Persulfato de Amônio - (NH₄)₂ S₂ O₈ - (SIGMA Chemical Company)

Acrilamida - (SIGMA Chemical Company)

HCl - Ácido Clorídrico - (MERCK)

Riboflavina - (SIGMA Chemical Company)

Glicina - (SIGMA Chemical Company)

Anexo B – Tabela das soluções utilizadas na Preparação do Gel de Poliacrilamida para volume final de 20 mL.

SOLUÇÕES	QUANTIDADE DE SOLUÇÃO PARA UM GEL			
	Gel Empilhador		Gel Separador	
	2,5%	4%	7,5%	11%
Sol. 1	2,5 mL	0,38 mL	5,0	7,45 mL
Sol. 2	5,0 mL	-	-	-
Sol. 3	-	0,2 mL	2,25 mL	1,25 mL
Sol. 4	-	0,2 mL	1,2 mL	1,00 mL
Sol. 5	2,5 mL	-	-	-
TEMED	0,015 mL	0,015 mL	0,015 mL	0,015 mL
água deionizada	10 mL	2,23 mL	11,55 mL	10,3 mL

Adaptado de Hames & Rickwood (1990) e Gahne et al. (1977)

Anexo C – Tabela das soluções adicionais, utilizadas nas técnicas eletroforéticas.

Soluções	componentes das soluções	pH
Tampão Tris-Glicina*	Tris 6,0 g Glicina 28,8g Água Deionizada q.s.p 1000 mL	8,3
Corante Coomassie	Comassie Blue R 250 (0,1%) Água Deionizada: Metanol: Ácido Acético (5:4:1)	
Descorante Coomassie	Água Deionizada 1000 mL Álcool Etílico 300 mL Ácido Acético 80 mL	
Solvente da Amostra	Glicerol 50 % Tris-Glicina * 50 %	
Indicador	Azul de Bromofenol 0,05% (0,5g) Água destilada 200 mL	
Fixador	Metanol 150 mL Ácido Acético 36 mL Água Deionizada q.s.p. 300 mL	
Preservante	Glicerol 50 mL Solução Descorante 450 mL	

- Diluir 1: 10 antes do uso